



دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده پزشکی مهندس افضلی پور

پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته قارچ شناسی پزشکی

عنوان:

تعیین تغییرات بیان ژنهای miR-212 و EGFR در نمونه های بالینی درماتوفیتی آلوده

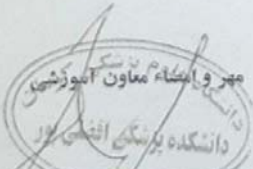
به ترایکوفیتون روبروم جدا شده از نقاط مبتلا در مقایسه با نقاط سالم مجاور

توسط: مریم اسفیدانی

استاد راهنما: دکترسید امین آیت الهی موسوی و دکتر سید امیر یزدان پرست

استاد مشاور: دکتر محمد شفیعی

سال تحصیلی: ۱۳۹۸-۱۳۹۷



چکیده

مقدمه و اهداف: عفونتهای پوستی با درماتوفیتها از عفونتهای رایج دردنیاست که کچلی نامیده می‌شود. بیشترین

عامل ایجاد کچلی بدن در دنیا، ترایکوفیتون روبروم (قارچ انساندوست) است. پپتیدآنتی میکروبیال (AMP) مانند HBD-3 و RNase7 مولکولهای موثر در ایمنی ذاتی پوست هستند که بالقوه اثر آنتی میکروبیال داشته و سرعت میکروارگانیسم ها را از بین میبرد که البته خود تحت تاثیر ژن EGFR قرارداشته و با افزایش بیان این ژن در سلولهای پوست فعال شده و مانع از کلونیزه شدن ارگانیسم ها از جمله درماتوفیتها در کراتینوسیتها میشود. اما با افزایش بیان میکروRNAها و بطور خاص miR-212 در تحقیق انجام شده، mRNA مربوط به ژن EGFR خاموش شده و کلونیزه شدن قارچ درماتوفیت در پوست منجر به ایجاد کچلی می شود. هدف از انجام این طرح تعیین تغییرات بیان ژنهای miR-212 و EGFR در نمونه های بالینی درماتوفیتی آلوده به ترایکوفیتون روبروم در نقاط مبتلا در مقایسه با نقاط سالم مجاور بوده است.

روشها: جمع آوری نمونه های بالینی که بطور پایه ۳۶ نمونه بافت آلوده به قارچ ترایکوفیتون روبروم تعیین شد، جمع آوری ۳۶ نمونه شاهد از حاشیه زخم مربوط به قسمتهای آلوده به قارچ در همان بیماران که دچار عفونت بودند، استخراج RNA تام و بهینه سازی آن، سنتز cDNA و بهینه سازی آن، تکثیر ژنهای EGFR و miR-212 به روش Real-Time PCR (سایبر گرین)، جمع بندی داده ها و آنالیز داده ها، انجام شد.

یافته ها: پس از آنکه پوسته ها را روی محیط مایکوزیل آگار کشت دادیم و کلنی های ترایکوفیتون روبروم بدست آمد به منظور بررسی اندام زایشی قارچ از کلنی ها اسلاید کالچر تهیه شد و وجود قارچ مورد نظر با درشت نمایی 40x میکروسکوپ تاییدشد. پس از استخراج RNA تام سلولی از هریک از نمونه های بالینی، غلظت هر نمونه با نانودراپ مشخص گردید. مقادیر بدست آمده برای نمونه ها بین ۱/۷ تا ۱/۹ توسط دستگاه خوانده شد که نشان دهنده خلوص قابل قبول RNA استخراج شده بود. سپس برای تعیین کیفیت و حفظ یکپارچگی RNA استخراج شده از هر نمونه روی ژل آگارز ۱٪ برده شد. یک اسمیر ملایم و یکنواخت از بالا تا پائین ژل دیده شد بعلاوه باندهای 28S و 18S ریبوزومی به طور واضح در هر نمونه مشاهده شد. در نهایت از هردو ژن مذکور به همراه ژنهای کنترل داخلی (GAPDH و miR-103a-3p) تست Real-TimePCR گذاشته شد که منحنی های حاصله در فصل چهارم پایان نامه موجود است.

نتیجه گیری: آنالیزهای بیوانفورماتیک نشان داد^د می تواند EGFR را بعنوان یک هدف بالقوه تحت

تاثیر قرار دهد، که البته اثبات آن نیاز به مطالعات عملکردی دارد. miR-212 در نمونه های بافتی آلوده به درماتوفیت

تریکوفیتون روبروم، میزان بیان ژن EGFR را بسیار کاهش داده و میزان بیان ژن miR-212 با اختلاف حدود ۸ برابرنسبت به بیان ژن EGFR، افزایش داشته است. از طرفی در نمونه‌های بافتی بعنوان شاهد، میزان بیان miR-212 نسبت به میزان بیان ژن EGFR بسیار کمتر است، پس فرد در نواحی حاشیه ضایعه کچلی عارض شده بعلت حضور ژن EGFR و به تبع آن حضور AMP ها، توانسته در برابر هجوم درماتوفیت تریکوفیتون روبروم مقاومت کند که به کچلی مبتلا نشود.

کلید واژه: کچلی - تریکوفیتون روبروم - بیان ژن - AMP - EGFR - (miR-212) - (Real -Time PCR)

Abstract

Introduction and Objectives: Skin infections with dermatophytes are common infections of the day called tinea. The most common cause of tinea corporis in the world is *Trichophyton rubrum* (humanized fungus). Antimicrobial peptides (AMPs), such as hBD-3 and RNase 7, are potent molecules in the inherent immunity of the skin, which potentially have anti-microbial effects and quickly eliminate microorganisms, which themselves are affected by the EGFR gene and by increasing the expression of this gene in skin cells activates and prevents cloning of organisms, including dermatophytes, in keratinocytes. However, with the increase in the expression of micro-RNAs and in particular miR-212 in the study, the EGFR gene mRNA is muted and colonization of dermatophytes in the skin leads to tinea. The purpose of this project was to determine the changes in the expression of miR-212 and EGFR genes in clinical specimens of dermatophytes infected with *Trichophyton rubrum* in affected areas compared with adjacent healthy spots.

Methods: Collection of clinical specimens which was based on 36 infected tissue samples of *Trichophyton rubrum*, collecting 36 control samples from the sore margin of the wound in the infected parts of the fungus in the same patients who were infected, total RNA extraction and optimization, synthesis of cDNA and its optimization, amplification of EGFR and miR-212 genes by Real-Time PCR (SYBR Green), data aggregation and data analysis.

Results: After cultivating the shells on the Mycosil Agar Environment, *Trichophyton rubrum* colonies were obtained, In order to evaluate the reproductive organs of dermatophyte from colonies, the slide cultures was prepared and the presence of the fungus was confirmed with an 40x microscope. After extracting total cellular RNA from each clinical

specimen, the concentration of each sample with the nanodrop was determined. The values obtained for samples were between 1.7 and 1.9 by the device, which indicated the acceptable purity of the RNA. Then, to determine the quality and maintain the integrity of the extracted RNA from each sample, 1% of the agarose gel was removed. A mild and uniform smear was seen from the top to the bottom of the gel, as well as the 28S and 18S bands and the 5S ribosomal RNA were clearly observed in each sample. Finally, the Real-Time PCR test was performed from the above-mentioned both of these genes with the internal control genes (GAPDH and miR-103a-3p), with the resulting curves available in the fourth chapter of the thesis.

Conclusion: Bioinformatics analysis showed that miR-212 could affect EGFR as a potential target, of course requires of functional studies. MiR-212 in tissues infected with *Trichophyton rubrum* dermatophyte significantly reduced the expression of EGFR gene and increased the expression of miR-212 gene with a difference of about 8 equivalents to EGFR gene expression. On the other hand, in tissue samples as controls, the expression rate of miR-212 is much lower than EGFR gene expression, so that the individual in the marginal areas of the affected tetanus due to the presence of the EGFR gene and, consequently the presence of the AMPs, it was able to resist the invasion of dermatophyte *Trichophyton*, which does not affect the tinea.

Key word: Tinea - *Trichophyton Rubrum* - Gene express – AMP - EGFR – (miR-212) - (Real-Time PCR)



Kerman University of Medical Sciences

Faculty of Medicine & physiology research center

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree(MSc)

Title:

**Determination of Changes in the Expression of MIR-212 and EGFR Genes in
isolated Clinical Samples from Areas Infected with Trichophyton rubrum
Compared with Non-Infected Areas**

By: Maryam Esfidani

Supervisor : Dr Seyed Amin Ayatollahi Mousavi

Dr Seyed Amir Yazdanparast

Year : 2018